การพัฒนาเทคนิค ELISA เพื่อวัดปริมาณฮีโมไซยานินในฮีโมลิมฟ์ของกุ้งแชบ๊วย

Development of ELISA for Quantifying Hemocyanin in Hemolymph of Banana Shrimp (*Fenneropenaeus merguiensis*)

อาจรีย์ เจียวก๊ก วท.ม. (Acharee Jiewkok, M.Sc.)[1]
พรรณี อัศวตรีรัตนกุล วท.ม. (Punnee Asawatreratanakul, M.Sc.)[2]
ประภาพร อุทารพันธุ์ ปร.ด. (Prapaporn Utarabhand, Ph.D.)[3]

บทคัดย่อ

ฮีโมไซยานินเป็นโปรตีนที่มีคอปเปอร์เป็นองค์ประกอบ พบมากในฮีโมลิมฟ์ของมอลลัส และอาร์โธรพอด ฮีโมไซยานินถูกพบเป็นสารตั้งต้นของสายเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อรา และถูกเปลี่ยนไปเป็นเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสโดยการกระตุ้นด้วยโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (Sodium dodecyl sulphate, SDS) เนื่องจากเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสมีบทบาทสำคัญในระบบภูมิคุ้มกันของครัสเตเชียน ดังนั้นฮีโมไซยานินน่าจะมีบทบาทเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันด้วย ในงานวิจัยนี้ได้ทำบริสุทธิ์ฮีโมไซยานินจากฮีโมลิมฟ์ของกุ้งแชบ๊วยด้วยวิธีอัลตราเซนตริฟิวจ์และโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิส (PAGE) แบบเตรียม ฮีโมไซยานินบริสุทธ์ปรากฏโปรตีน 1 แถบ ใน PAGE แบบไม่แปลงสภาพ และมีหน่วยย่อย 2 ขนาดคือ 75 และ 79.4 kDa ใน SDS-PAGE แอนติบอดีที่ได้สังเคราะห์ต่อฮีโมไซยานินบริสุทธิ์ในกระต่าย พบว่ามีความจำเพาะสูงต่อฮีโมไซยานินในฮีโมลิมฟ์และถูกใช้ในการพัฒนาเทคนิค ELISA ให้มีความไวสูง โดยสามารถวัดฮีโมไซยานินที่มีปริมาณต่ำถึง 10 นาโนกรัมได้ จากการวิเคราะห์โดยวิธี ELISA พบปริมาณฮีโมไซยานินคิดเป็น 85.67% ของโปรตีนทั้งหมดในฮีโมลิมฟ์ของกุ้งแชบ๊วยปกติ และเมื่อฉีดกุ้งด้วยแบคทีเรียก่อโรค พบว่าฮีโมไซยานินในฮีโมลิมฟ์มีปริมาณเพิ่มขึ้นจนมีค่าสูงสุดที่ 12 ชั่วโมง หลังการฉีด บ่งชี้ว่าฮีโมไซยานินถูกกระตุ้นให้มีปริมาณเพิ่มขึ้นและอาจเกี่ยวข้องในระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งเพื่อตอบสนองต่อแบคทีเรียก่อโรค

คำสำคัญ : ฮีโมไซยานิน ฟีนอลออกซิเดส กุ้งแชบ๊วย ระบบภูมิคุ้มกันของกุ้ง

Abstract

Hemocyanin (HC) is a copper-binding protein that represents as a main protein in hemolymph of mollusks and arthropods. HC is found to be a precursor of antifungal peptide and converted to be a phenoloxidase-like enzyme by sodium dodecyl sulphate (SDS) treatment. As phenoloxidase plays important roles in immune response of crustaceans, suggests that HC may also be involved in the immune system. In this study, HC was purified from the hemolymph of *Fenneropenaeus merguiensis* by ultracentrifugation and subsequently by preparative polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). Purified HC showed a single protein band in non-denaturing PAGE and two bands of 75 and 79.4 kDa in SDS-PAGE. Anti-HC antibody raised in a rabbit against purified HC, was highly specific to HC in the hemolymph and used to develop an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). Due to the development, the sensitive ELISA was able to quantify HC content as low as 10 ng per assay. By ELISA analysis, HC content was 85.67% of total protein in the hemolymph of normal banana shrimps. Moreover, HC levels in the hemolymph of bacterial injected

[1] นักศึกษาปริญญาเอก คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
[2] ผู้ช่วยศาตราจารย์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
[3] รองศาตราจารย์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

shrimps, were increased and reached the highest at 12 h post-injection. These results indicate that HC is inducible and may be involved in shrimp immune response to pathogenic bacteria.

Keywords : Hemocyanin, phenoloxidase, *Fenneropenaeus merguiensis,* shrimp immunity

บทนำ

อาหารทะเลโดยเฉพาะกุ้งเป็นที่นิยมบริโภคทั้งภายในและต่างประเทศอย่างต่อเนื่อง เนื่องจากกุ้งมีรสชาติดี มีคุณค่าทางโภชนาการสูง และมีไขมันต่ำ (ประจวบ หลำอุบล, 2531) ทำให้อุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเลสามารถทำรายได้ให้แก่ประเทศไทยเป็นอย่างมาก ประเทศไทยได้มีการพัฒนาเทคนิคการเพาะเลี้ยงจนสามารถเลี้ยงกุ้งในระบบหนาแน่นได้ ที่ผ่านมากุ้งที่นิยมเพาะเลี้ยงคือกุ้งกุลาดำ (Black tiger shrimp, *Penaeus monodon*) แต่จากการประสบปัญหาการขาดแคลนพ่อแม่พันธุ์กุ้งที่แข็งแรงเพื่อใช้ในการเพาะฟักลูกกุ้ง ทำให้ต้นทุนในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำสูงขึ้น รวมทั้งกุ้งกุลาดำมีการติดโรคจากเชื้อไวรัส (Virus) อย่างรุนแรง ทำให้เกษตรกรหันมาทดลองเพาะเลี้ยงกุ้งขาว (White shrimp, *Litopenaeus vannamei*) กันอย่างกว้างขวาง ซึ่งต้องนำเข้าพ่อแม่พันธุ์จากต่างประเทศทำให้ต้นทุนสูงและกุ้งขาวที่นำเข้าอาจเป็นพาหะนำโรคต่างๆ ปัจจุบันมีรายงานการเกิดโรคตายด่วน (Early mortality syndrome, EMS) ระบาดในกุ้งขาวที่เพาะเลี้ยงรวมทั้งในประเทศไทย ซึ่งยังไม่มีรายงานของสาเหตุโรคที่แน่ชัด แต่ก่อปัญหาต่อการเพาะเลี้ยงกุ้งขาวเป็นอย่างมาก กุ้งแชบ๊วย (Banana shrimp, *Fenneropenaeus merguiensis*) จึงอาจเป็นอีกทางเลือกหนึ่งของอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้ง เนื่องจากมีข้อได้เปรียบเรื่องต้นทุนการผลิตลูกกุ้ง เพราะกุ้งแชบ๊วยสามารถเจริญพันธุ์ได้รวดเร็วและสามารถใช้พ่อแม่พันธุ์ที่เลี้ยงในบ่อดินในการผลิตลูกกุ้งได้ (สุพจน์ จึงแย้มปิ่น และชัยรัตน์ พุ่มช่วย, 2543) หากสามารถเลี้ยงกุ้งแชบ๊วยให้ได้ขนาดที่ต้องการของตลาดจะมีราคาสูงกว่ากุ้งกุลาดำที่มีขนาดเท่ากัน (เมธี วัฒนสิงห์, 2543) นอกจากนี้กุ้งแชบ๊วยเป็นกุ้งท้องถิ่นประเทศไทยจึงน่าจะทนต่อการเกิดโรคระบาดได้ดีกว่ากุ้งขาว แต่ในการเพาะเลี้ยงกุ้งระบบหนาแน่นทำให้กุ้งเครียดและอ่อนแอ ทำให้มีปัญหาที่หลีกเลี่ยงได้ยากคือการติดเชื้อก่อโรคในกุ้ง แบคทีเรียก่อโรคที่พบมากในไทยคือ *Vibrio harveyi* ซึ่งเมื่อกุ้งได้รับเชื้อนี้จะเกิดเป็นโรคเรืองแสง ทำให้กุ้งตาย การศึกษาโปรตีนที่มีบทบาทในระบบภูมิคุ้มกันของกุ้ง จึงเป็นสิ่งสำคัญต่อการเพาะเลี้ยง

กุ้งเป็นสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังในกลุ่มครัสเตเชียน (Crustacean) มีระบบไหลเวียนเลือดที่เรียกว่า ฮีโมลิมฟ์ (Hemolymph) เป็นแบบเปิด และมีการป้องกันตนเองโดยอาศัยระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิด (Innate immunity) ซึ่งมีสองระบบคือภูมิคุ้มกันแบบอาศัยเซลล์ (Cellular immunity) ซึ่งมักใช้เซลล์เม็ดเลือดฮีโมไซท์ (Hemocyte) ในการกำจัดจุลินทรีย์บุกรุก โดยอาศัยกระบวนการกลืนกินเซลล์แบบฟาโกไซโทซิส (Phagocytosis) การเกิดโนดูล (Nodule formation) และการกักล้อมสิ่งแปลกปลอม (Encapsulation) เมื่อมีจุลินทรีย์บุกรุกจะมีการสลายกรานูล (Granule) ในเซลล์ฮีโมไซท์นำไปสู่การหลั่งสารที่เป็นองค์ประกอบของระบบโปรฟีนอลออกซิเดส (Prophenoloxidase system) ที่สามารถเปลี่ยนโปรฟีนอลออกซิเดสไปเป็นเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส (Phenoloxidase) ที่แอคทีฟ (Aspan & Söderhäll, 1991; Aspan , Huang, Cerenius & Söderhäll, 1995) และมีความสำคัญในการสังเคราะห์เมลานิน (Melanin) ซึ่งทำหน้าที่ยับยั้งหรือป้องกันการเจริญเติบโตของแบคทีเรียบุกรุกได้ (Söderhäll & Cerenius, 1998) อีกระบบคือภูมิคุ้มกันแบบอาศัยสารน้ำ (Humoral immunity) ที่ประกอบด้วยโปรตีนและเอนไซม์ต่างๆ ซึ่งในสภาวะปกติจะมีปริมาณน้อยมาก โดยจะถูกหลั่งออกมามีปริมาณเพิ่มขึ้นในฮีโมลิมฟ์เมื่อสัตว์เกิดการติดเชื้อ

ในฮีโมลิมฟ์ของครัสเตเชียน มีโปรตีนหลายชนิดที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับกลไกการป้องกันตนเอง ซึ่งมีรายงานว่า 80-95% ของโปรตีนในฮีโมลิมฟ์เป็นโปรตีนฮีโมไซยานิน (Hemocyanin) (Adachi, Endo, Watanabe, Nishioka & Hirata 2005; Van Holde & Miller, 1995) ที่มีคอปเปอร์ (Cu, copper) เป็นองค์ประกอบ มีหลายหน่วยย่อย (Subunit)

ถูกสังเคราะห์จากตับ (Hepatopancreas) (Spindler, Hennecke & Gellissen 1992) และทำหน้าที่หลากหลาย เช่น ขนส่งออกซิเจน (Van Holde & Miller, 1995) เป็นตัวปรับแรงดันในฮีโมลิมฟ์ (Paul & Pirow, 1998) ขนส่งฮอร์โมนลอกคราบ Ecdysone (Jaenicke, Foll & Decker 1999) หรือเป็นสารตั้งต้นของสายเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อราได้ (Destoumieux-Garzon et al., 2001) ฮีโมไซยานินของกุ้ง *Penaeus japonicus* ถูกกระตุ้นด้วย Sodium dodecyl sulphate (SDS) หรือเอนไซม์ทริปซิน (Trypsin) ให้มีแอคทิวิที (Activity) ของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสเหมือนกับเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสที่พบในเซลล์ฮีโมไซท์ (Adachi, Hirata, Nagai & Sakaguchi 2001) จากคุณสมบัติของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสที่มีบทบาทเกี่ยวข้องกับกลไกการป้องกันตนเองของครัสเตเชียน บ่งชี้ว่าฮีโมไซยานินก็น่าจะเป็นโปรตีนหนึ่งที่มีบทบาทเกี่ยวข้องกับกลไกการป้องกันตนเองของครัสเตเชียนเช่นกัน แต่เนื่องจากยังไม่เคยมีการศึกษาฮีโมไซยานินในกุ้งแชบ๊วยมาก่อน ตลอดจนการศึกษาบทบาทของฮีโมไซยานินที่เกี่ยวข้องกับการป้องกันตนเองในสัตว์กลุ่มครัสเตเชียนยังมีน้อย และเนื่องจากฮีโมไซยานินเป็นโปรตีนที่ไม่มีแอทิวิทีเช่นเอนไซม์อื่นๆ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะพัฒนาวิธี ELISA ให้มีความจำเพาะและมีความไว (Sensitive) เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณฮีโมไซยานิน โดยการทำให้ฮีโมไซยานินบริสุทธิ์จากฮีโมลิมฟ์ของกุ้งแชบ๊วย เพื่อนำไปใช้ในการสังเคราะห์แอนติบอดีต่อฮีโมไซยานินบริสุทธิ์ แล้วนำแอนติบอดีนี้ไปพัฒนาเทคนิค ELISA เพื่อใช้หาปริมาณฮีโมไซยานินในฮีโมลิมฟ์ของกุ้งแชบ๊วยปกติหรือกุ้งที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยจุลินทรีย์ก่อโรค โดยงานวิจัยนี้เลือก *V. harveyi* เป็นตัวแทนของแบคทีเรียก่อโรคกุ้ง เนื่องจากผลการศึกษาเบื้องต้น คณะผู้วิจัยพบว่ากุ้งแชบ๊วยมีการตอบสนองต่อการติดเชื้อก่อโรค *V. harveyi* ดีกว่าเชื้อ *Vibrio* ชนิดอื่นๆ ถึงแม้ว่าความรู้เบื้องต้นจากงานวิจัยนี้ยังไม่สามารถนำไปแก้ปัญหาการติดโรคกุ้งโดยตรงได้ แต่เป็นการเตรียมความพร้อมด้านข้อมูลพื้นฐานนำไปสู่การวิจัยระดับลึกเกี่ยวกับกลไกการป้องกันตนเองต่อเชื้อก่อโรคในกุ้งพีเนียดต่อไป

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อทำให้ฮีโมไซยานินบริสุทธิ์จากฮีโมลิมฟ์ของกุ้งแชบ๊วยและนำไปใช้สังเคราะห์แอนติบอดีต่อฮีโมไซยานินบริสุทธิ์ในกระต่าย
2. เพื่อพัฒนาเทคนิค ELISA เพื่อใช้หาปริมาณฮีโมไซยานินในฮีโมลิมฟ์ของกุ้งแชบ๊วยปกติและกุ้งที่ฉีดด้วย แบคทีเรียก่อโรค

ระเบียบวิธีวิจัย

1. กุ้งตัวอย่าง

กุ้งที่ใช้ศึกษาคือ กุ้งแชบ๊วยเพศผู้ ที่มีน้ำหนักประมาณ 20-30 กรัม ไม่อยู่ในระยะลอกคราบ จับจากทะเลอันดามัน นำมาเลี้ยงในถังพลาสติกขนาด 100 ลิตร โดยให้อาหารเม็ดทุก 8 ชั่วโมง ที่ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

2. การเตรียมตัวอย่างฮีโมลิมฟ์จากกุ้งแชบ๊วย

ดูดเลือดจากกุ้งแชบ๊วยด้วยกระบอกฉีดยาขนาด 5 มิลลิลิตร ที่มีเข็มขนาด 24G ความยาว 1 นิ้ว จากบริเวณขาเดินคู่ที่ 3 เก็บเลือดที่อุณหภูมิ 4 °C จากนั้นนำไปเซนตริฟิวจ์ (Centrifuge) ที่ความเร็ว 800 x g ที่อุณหภูมิ 4 °C นาน 5 นาที นำส่วนใสหรือซีรัม (Serum) หรือในที่นี้เรียกฮีโมลิมฟ์ ไปเก็บที่อุณหภูมิ -20 °C เพื่อใช้ในการแยกฮีโมไซยานินหรือวัดหาปริมาณต่อไป

3. การทำบริสุทธิ์ฮีโมไซยานินจากฮีโมลิมฟ์ของกุ้งแชบ๊วย

นำฮีโมลิมฟ์ที่เตรียมได้จากข้อ 2. หลอดละ 10 มิลลิลิตร ไปเซนตริฟิวจ์ในเครื่องอัลตราเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 200,000 x g ที่อุณหภูมิ 4 °C นาน 4 ชั่วโมง (Adachi, Hirata, Nagai & Sakaguchi 2001) จากนั้นดูดสารละลายจากส่วนบนเป็นส่วนๆ หลอดละ 0.8 มิลลิลิตร ส่วนตะกอนละลายด้วย 10 mM Tris-HCl, pH 7.8 - 5 mM $MgCl_2$ - 5 mM $CaCl_2$ นำสารละลายแต่ละหลอดไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร (วัดโปรตีนที่มีคอปเปอร์เป็นองค์ประกอบ) และหาปริมาณโปรตีนตามวิธีของ Bradford (1976) นำสารละลายหลอดที่มีฮีโมไซยานิน (ค่า A340 สูง) ไปทำบริสุทธิ์ต่อด้วยวิธี preparative PAGE โดยการแยกสารละลายฮีโมไซยานินด้วยโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบไม่แปลงสภาพ (Non-denaturing PAGE) (Davis, 1964) ตัดเฉพาะแถบโปรตีนที่เป็นฮีโมไซยานิน แล้วชะโปรตีนออกจากชิ้นเจลด้วยเครื่องอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบแนวนอน สารละลายที่ชะได้นำไปทำให้เข้มข้น และทดสอบความบริสุทธิ์ของฮีโมไซยานินที่แยกได้ด้วยการทำ Non-denaturing PAGE

4. การสังเคราะห์แอนติบอดีต่อฮีโมไซยานินบริสุทธิ์ในกระต่าย

สังเคราะห์แอนติบอดีต่อฮีโมไซยานินบริสุทธิ์ในกระต่ายขาว ตาแดง ดังนี้ สัปดาห์ที่ 1 และ 2 ฉีดฮีโมไซยานินบริสุทธิ์สัปดาห์ละ 20 ไมโครกรัม ผสมกับ Freund's complete adjuvant และอีก 2 สัปดาห์ต่อมา ฉีดฮีโมไซยานิน 20 ไมโครกรัม ผสมกับ Freund's incomplete adjuvant หลังการฉีดครั้งสุดท้าย 2 สัปดาห์ เจาะเลือดกระต่ายจำนวนมาก ปล่อยให้เลือดแข็งตัวที่ 4 °C นาน 1 คืน หลังการเซนตริฟิวจ์นำซีรัมไปตกตะกอนด้วยเกลือ Ammonium sulphate ที่ความอิ่มตัว 50% แล้วแยกแอนติบอดีต่อด้วยคอลัมน์ DEAE-Sephacel (Auttarat, Phiriyangkul & Utarabhand, 2006; Wallace, 1965) ทดสอบการมีแอนติบอดีด้วยวิธี Ouchterlony double immunodiffusion ตามวิธีของ Ouchterlony (1956) และทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีด้วยวิธี SDS-PAGE (Laemmli, 1970) และ Western blot (Auttarat, Phiriyangkul & Utarabhand, 2006)

5. การพัฒนาวิธี ELISA และการหาปริมาณฮีโมไซยานิน

การวัดปริมาณฮีโมไซยานินโดย ELISA มีการใช้แอนติบอดี 2 ชนิด คือ แอนติบอดีต่อฮีโมไซยานินบริสุทธิ์ของกุ้งแชบ๊วย (1°Ab) และแอนติบอดีต่อ IgG ของกระต่ายซึ่งยึดติดกับเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส (2°Ab)

5.1 การหาภาวะที่เหมาะสมในการทำ ELISA

การวิเคราะห์ปริมาณฮีโมไซยานินในฮีโมลิมฟ์ด้วยวิธี ELISA ต้องอาศัยหลายปัจจัยในการทำ ได้แก่ การใช้ปริมาณแอนติบอดีที่เหมาะสม การหา pH ที่เหมาะสมในช่วง 9 - 11.2 ของการเคลือบฮีโมไซยานินกับเพลท และการใช้ความเข้มข้นของฮีโมลิมฟ์ที่เหมาะสมในการทำ ELISA ซึ่งทำการทดลองโดยดัดแปลงวิธีของ Rittidach (2006) ดังนี้ ใช้ฮีโมไซยานินบริสุทธิ์ปริมาณ 800 นาโนกรัม ที่เตรียมในบัฟเฟอร์เคลือบ (50 mM Na_2CO_3, pH 9.6) เคลือบผิวเพลทหรือไมโครไตเตอร์เพลท (Microtiter plate) บ่มที่อุณหภูมิ 4 °C อย่างน้อย 12 ชั่วโมง จากนั้นล้างเพลทด้วยบัฟเฟอร์ล้าง (50 mM Potassium phosphate buffer, pH 7.4 - 0.05% Tween 20) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ล้างซ้ำ 3 ครั้ง จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ขัดขวาง (0.1 M Potassium phosphate buffer, pH 7.4 - 5% skim milk - 0.05% Tween 20) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ล้างออกด้วยบัฟเฟอร์ล้าง 3 ครั้ง แล้วเติม 1°Ab ที่เจือจางด้วยความเข้มข้นต่างๆ กัน ปริมาตร 150 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง ล้างออกด้วยบัฟเฟอร์ล้าง 3 ครั้ง เติมสารละลาย 2°Ab ที่เจือจางด้วยความเข้มข้นต่างๆ กัน ปริมาตร 150 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง ล้างด้วยบัฟเฟอร์ 3 ครั้ง เติมสารละลาย OPD (0.4 mg/ml O-phenylenediamine ใน 50 mM citrate buffer, pH 5) ที่มี 0.01% H_2O_2 ปริมาตร 150 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม 2 M H_2SO_4 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร (A492) ด้วยเครื่อง ELISA Reader

5.2 การหาปริมาณฮีโมไซยานินในฮีโมลิมฟ์ด้วยวิธี ELISA

จากผลการทดลองข้อ 5.1 นำมาใช้หาปริมาณฮีโมไซยานินด้วยวิธี ELISA ดังนี้ ใช้ฮีโมลิมฟ์ที่เจือจาง 1:200 เท่า ด้วยบัฟเฟอร์เคลือบที่มี pH ที่เหมาะสมคือ pH 10.5 นำไปเคลือบผิวเพลทแต่ละหลุม จากนั้นทำการทดลองตามวิธีข้อ 5.1 ต่อไป โดยใช้ 1°Ab และ 2°Ab ที่เจือจาง 1:2,000 และ 1:25,000 เท่า ตามลำดับ ในการทำ ELISA นำค่าแอคทิวิทีของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่วัดได้ ไปคำนวณหาปริมาณฮีโมไซยานินในฮีโมลิมฟ์ได้โดยการเทียบกับกราฟมาตรฐานฮีโมไซยานินบริสุทธิ์ ซึ่งทำในทำนองเดียวกัน แต่ใช้ปริมาณฮีโมไซยานินบริสุทธิ์ในช่วง 5 - 69 ไมโครกรัมเคลือบผิวเพลทแทนฮีโมลิมฟ์

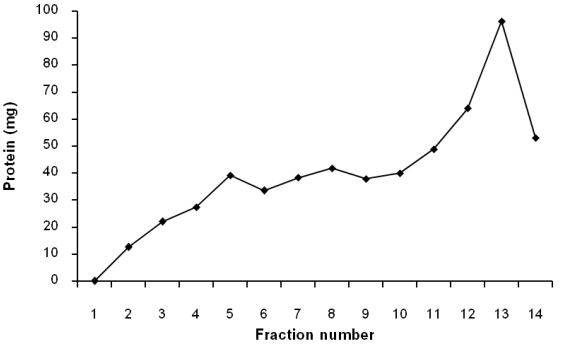
6. การศึกษาผลของการฉีด *V. harveyi* ต่อระดับฮีโมไซยานินในฮีโมลิมฟ์ของกุ้งแชบ๊วย

คัดเลือกกุ้งแชบ๊วยที่มีขนาดใกล้เคียงกัน น้ำหนักประมาณตัวละ 20 กรัม เลี้ยงในถังพลาสติก ถังละ 4-5 ตัว จากนั้นนำเชื้อ *V. harveyi* ($5x10^8$ cells/ml) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ฉีดกุ้งที่บริเวณกล้ามเนื้อโคนหาง สำหรับกุ้งที่เป็นกลุ่มควบคุมฉีดด้วยน้ำเกลือ (0.85% NaCl, saline) ปริมาตรเท่ากัน จากนั้นนำกุ้งไปเลี้ยงต่อตามปกติ ดูดเลือดจากกุ้งแต่ละตัวที่ถูกฉีดด้วยเชื้อหรือจากกลุ่มควบคุมที่เวลา 0, 6, 12, 18 และ 24 ชั่วโมง นำไปเตรียมฮีโมลิมฟ์ตามวิธีการข้อ 2 แล้วหาปริมาณฮีโมไซยานินด้วยวิธี ELISA

ผลการวิจัย

1. การทำให้ฮีโมไซยานินบริสุทธิ์

จากการแยกฮีโมลิมฟ์ของกุ้งแชบ๊วยด้วยการทำอัลตราเซนตริฟิวจ์ แล้วเก็บสารละลายเป็นส่วนๆ และนำไปหาปริมาณโปรตีนและวัดค่า A340 ของคอปเปอร์ พบว่าสารละลายหลอดที่ 13 มีปริมาณโปรตีน (ภาพที่ 1) และค่า A340 มากสุด บ่งชี้ว่าสารละลายหลอดที่ 13 มีปริมาณฮีโมไซยานินมากกว่าสารละลายหลอดอื่นๆ เมื่อนำสารละลายหลอดที่ 13 ไปแยกต่อโดยวิธี Preparative PAGE พบว่าสารละลายที่แยกได้ปรากฏโปรตีนเพียงแถบเดียวเมื่อย้อมแบบซิลเวอร์ (ภาพที่ 2A แถวที่ 4) บ่งชี้ว่าการทำ Preparative PAGE สามารถแยกฮีโมไซยานินได้บริสุทธิ์ และปรากฏแถบโปรตีน 2 แถบ ที่มีมวลโมเลกุล 75 และ 79.4 kDa (ภาพที่ 2B แถวที่ 4) เมื่อวิเคราะห์โดยวิธี SDS-PAGE บ่งชี้ว่าฮีโมไซยานินบริสุทธิ์ประกอบด้วยหน่วยย่อย 2 ขนาด

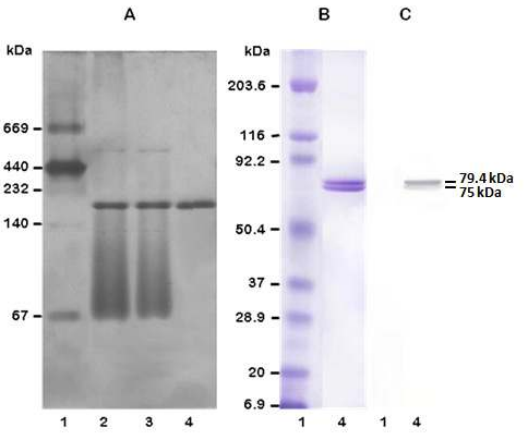


ภาพที่ 1 การแยกฮีโมไซยานินจากฮีโมลิมฟ์โดยการทำอัลตราเซนตริฟิวจ์

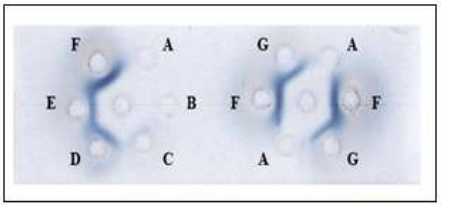
2. การสังเคราะห์แอนติบอดีต่อฮีโมไซยานินบริสุทธิ์

จากการฉีดกระต่ายเพื่อกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีด้วยฮีโมไซยานินบริสุทธิ์ และทดสอบการมีแอนติบอดีโดยวิธี Ouchterlony double immunodiffusion พบว่ากระต่ายเริ่มสังเคราะห์แอนติบอดีหลังการฉีดสัปดาห์ที่ 4 (ภาพที่ 3 หลุม C) และมีการสังเคราะห์เพิ่มมากขึ้นหลังการฉีดสัปดาห์ที่ 5 และ 6 ตามลำดับ (ภาพที่ 3 หลุม D และ E) ทั้งนี้ไม่พบแอนติบอดี

ต่อฮีโมไซยานินบริสุทธิ์ในซีรัมของกระต่ายก่อนการฉีดแอนติบอดี (ภาพที่ 3 หลุม A) จะเห็นได้ว่ากระต่ายมีการสังเคราะห์แอนติบอดีต่อฮีโมไซยานินบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นเมื่อถูกกระตุ้นด้วยแอนติเจน เมื่อทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีด้วยวิธี SDS-PAGE และ Western blot พบเฉพาะโปรตีน 2 แถบ ของหน่วยย่อยของ HC เท่านั้นที่เกิดปฏิกิริยากับแอนติบอดี บ่งชี้ว่าแอนติบอดีต่อฮีโมไซยานินบริสุทธิ์มีความจำเพาะสูงเพราะเกิดปฏิกิริยากับเฉพาะฮีโมไซยานินบริสุทธิ์ (ภาพที่ 2C แถวที่ 4) และกับฮีโมไซยานินในฮีโมลิมฟ์เท่านั้น โดยไม่เกิดปฏิกิริยากับโปรตีนชนิดอื่นๆ ในฮีโมลิมฟ์ (ไม่ได้แสดงผลไว้) หรือกับโปรตีนมาตรฐาน (ภาพที่ 2C แถวที่ 1)



ภาพที่ 2 แบบแผนโปรตีนของฮีโมไซยานินใน Non-denaturing PAGE (A), SDS-PAGE (B) และ Western blot (C) แถวที่ 1 โปรตีนมาตรฐาน แถวที่ 2 ฮีโมลิมฟ์ของกุ้งแชบ๊วย แถวที่ 3 สารละลายหลอดที่ 13 จากการทำอัลตราเซนตริฟิวจ์ และแถวที่ 4 สารละลายโปรตีนจากการทำ Preparative PAGE



ภาพที่ 3 การทำ Ouchterlony double immunodiffusion ของแอนติบอดีต่อฮีโมไซยานินบริสุทธิ์ในซีรัมกระต่าย หลุม A ซีรัมก่อนการฉีดแอนติบอดี หลุม B, C, D และ E ซีรัมหลังฉีดฮีโมไซยานินบริสุทธิ์สัปดาห์ที่ 2, 4, 5 และ 6 ตามลำดับ หลุม F ซีรัมที่ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต และหลุม G แอนติบอดีหลังผ่านคอลัมน์ DEAE-Sephacel

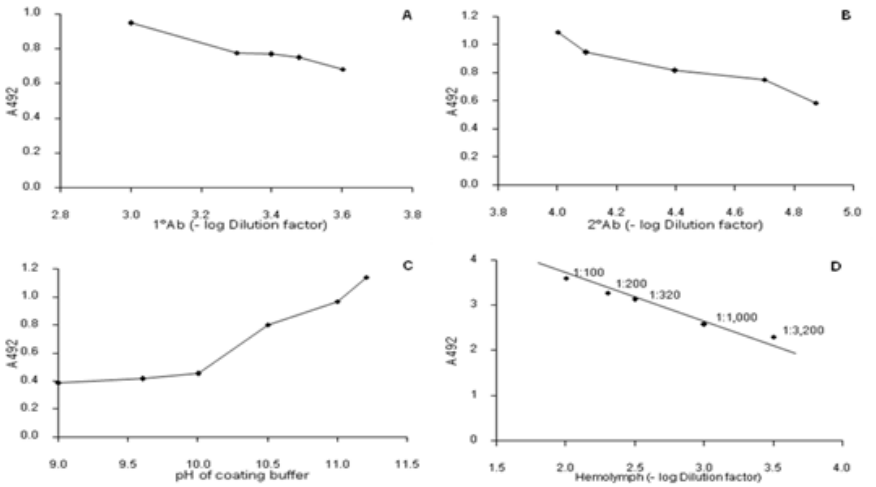
3. การพัฒนาเทคนิค ELISA เพื่อใช้วัดปริมาณฮีโมไซยานินในฮีโมลิมฟ์

โดยทั่วไปมีรายงานการเตรียมโปรตีนในบัฟเฟอร์เคลือบที่ pH 9.0 - 9.6 เพื่อใช้เคลือบเพลท (Auttarat, Phiriyangkul & Utarabhand, 2006) แต่ในงานวิจัยนี้พบว่าฮีโมไซยานินบริสุทธิ์ที่เตรียมในบัฟเฟอร์เคลือบ pH 9.0 และ 9.5 จับกับเพลทด้วยปริมาณน้อยมาก ดังนั้นจึงลองใช้บัฟเฟอร์เคลือบที่ pH 10.0 - 11.2 พบว่าฮีโมไซยานินบริสุทธิ์จับกับเพลทได้มากขึ้นตาม pH ที่เพิ่มขึ้น (ภาพที่ 4C) ดังนั้นจึงเลือกใช้บัฟเฟอร์เคลือบช่วง pH กลางระหว่าง 10.0 - 11.2 คือใช้ที่ pH 10.5 ในการทำ ELISA เพื่อไม่ให้ฮีโมไซยานินอยู่ในบัฟเฟอร์ที่เป็นเบสมากเกินไป และยังสามารถจับกับเพลทได้ดี และจากการทดสอบปัจจัยอื่นๆ สรุปผลการทดลองการหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณฮีโมไซยานินด้วยวิธี ELISA เป็นดังนี้

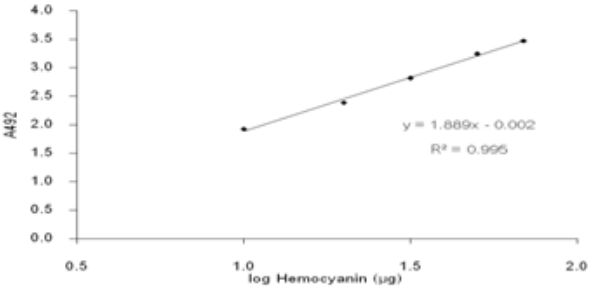
เจือจางฮีโมลิมฟ์ด้วยอัตราส่วน 1:200 ในบัฟเฟอร์เคลือบที่ pH 10.5 และใช้ 1°Ab และ 2°Ab ที่เจือจาง 1:2,000 และ 1:25,000 เท่า ตามลำดับ ดังแสดงผลในภาพที่ 4 (A-D)

จากการทำกราฟมาตรฐานของฮีโมไซยานินบริสุทธิ์เพื่อใช้ในการคำนวณหาปริมาณของฮีโมไซยานินในฮีโมลิมฟ์ของกุ้งแชบ๊วยโดยวิธี ELISA พบค่า A492 เพิ่มขึ้นเป็นเส้นตรงตามปริมาณของฮีโมไซยานินบริสุทธิ์ที่เพิ่มขึ้นในช่วง 10 - 69 ไมโครกรัม และมีค่า Correlation coefficient R^2 = 0.995 (ภาพที่ 5) จากการใช้ฮีโมไซยานินบริสุทธิ์ปริมาณน้อยคือที่ 5 ไมโครกรัมต่อหลุม จะให้ค่า A492 ที่อยู่นอกกราฟมาตรฐาน ดังนั้นจึงใช้ปริมาณฮีโมไซยานินบริสุทธิ์ในช่วง 10 - 69 ไมโครกรัมต่อหลุม เป็นกราฟมาตรฐาน (ภาพที่ 5) และควรใช้ตัวอย่างฮีโมลิมฟ์ที่มีปริมาณฮีโมไซยานินตั้งแต่ 10 นาโนกรัม หรือมากกว่าในการวิเคราะห์ด้วยวิธี ELISA

จากการวัดปริมาณฮีโมไซยานินในฮีโมลิมฟ์ของกุ้งแชบ๊วยปกติ 6 ตัวอย่าง โดยเจือจางฮีโมลิมฟ์ด้วยอัตราส่วน 1:200 และวิเคราะห์ด้วยวิธี ELISA พบว่าปริมาณฮีโมไซยานินในฮีโมลิมฟ์มีค่าเฉลี่ย±ค่าผิดพลาดมาตรฐาน เป็น 111.07±3.58 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ขณะที่โปรตีนทั้งหมดในฮีโมลิมฟ์มีค่าเฉลี่ย±ค่าผิดพลาดมาตรฐาน เป็น 129.65±4.63 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ดังนั้นปริมาณฮีโมไซยานินที่หาได้ด้วยวิธี ELISA จึงคิดเป็น 85.67% ของโปรตีนทั้งหมดในฮีโมลิมฟ์ของกุ้งแชบ๊วยปกติ



ภาพที่ 4 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำ ELISA (A) ปริมาณแอนติบอดีต่อฮีโมไซยานินบริสุทธิ์ (1°Ab) (B) ปริมาณแอนติบอดีต่อ IgG ของกระต่ายซึ่งยึดติดกับเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส (2°Ab) (C) pH ที่เหมาะสมของการเคลือบฮีโมไซยานินกับเพลท และ (D) การเจือจางตัวอย่างฮีโมลิมฟ์ที่เหมาะสม



ภาพที่ 5 กราฟมาตรฐานของฮีโมไซยานินบริสุทธิ์ในการวิเคราะห์โดยวิธี ELISA

4. ปริมาณฮีโมไซยานินในฮีโมลิมฟ์ของกุ้งแชบ๊วยที่ถูกฉีดด้วย *V. harveyi*

เมื่อวัดปริมาณฮีโมไซยานินในฮีโมลิมฟ์ของกุ้งที่ถูกฉีดด้วย *V. harveyi* หรือกุ้งกลุ่มควบคุม ที่เวลาต่างๆ ด้วยวิธี ELISA พบว่าฮีโมไซยานินในฮีโมลิมฟ์ของกุ้งที่ถูกฉีดด้วย *V. harveyi* มีปริมาณเพิ่มขึ้นจากปริมาณ ณ ชั่วโมงที่ 0 จนเพิ่มสูงสุดที่ชั่วโมง 12 แล้วมีค่าเริ่มลดลงตามลำดับ ณ ชั่วโมงที่ 18 และ 24 หลังการฉีด ในขณะที่ฮีโมไซยานินในฮีโมลิมฟ์ของกุ้งชุดควบคุมมีปริมาณไม่แตกต่างกันในช่วง 0 - 24 ชั่วโมง (ตารางที่ 1) จะเห็นว่าฮีโมไซยานินมีรูปแบบที่ตอบสนองต่อการฉีดเชื้อ *V. harveyi* ซึ่งบ่งชี้ว่าฮีโมไซยานินถูกกระตุ้นได้ด้วยเชื้อก่อโรคกุ้งและน่าจะมีบทบาทเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันในกุ้ง

ตารางที่ 1 ปริมาณฮีโมไซยานินในฮีโมลิมฟ์ที่เพิ่มขึ้นจากชั่วโมงที่ 0 ของกุ้งที่ถูกฉีดด้วย *V. harveyi* ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี ELISA

Time post-injection (hour)	Increment of HC content in the hemolymph (mg/ml)	
	***V. harveyi* injection**	**Saline injection**
0	0	0
6	4.2	1.2
12	6.4	0.4
18	2.9	0
24	2	0.4

อภิปรายผล

ในงานวิจัยนี้ได้ทำให้ฮีโมไซยานินบริสุทธิ์จากฮีโมลิมฟ์ของกุ้งแชบ๊วยโดยวิธีอัลตราเซนตริฟิวจ์ และ Preparative PAGE พบว่า ฮีโมไซยานินบริสุทธิ์ปรากฏโปรตีน 2 แถบ ที่มีมวลโมเลกุล 79.4 และ 75 kDa ใน SDS-PAGE ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับหน่วยย่อยของฮีโมไซยานินของกุ้ง *P. japonicus* ที่มีมวลโมเลกุล 77 และ 67 kDa (Adachi, Hirata, Nagai & Skaguchi, 2001) และกุ้งขาวที่มีมวลโมเลกุล 82 และ 75 kDa (Figueroa-Soto, De la Barca, Vazquez-Moreno, Higuera-Ciapara & Yepiz Plascencia, 1997) จากการกระตุ้นให้กระต่ายสังเคราะห์แอนติบอดีต่อฮีโมไซยานินบริสุทธิ์ พบว่า แอนติบอดีที่เตรียมได้มีความจำเพาะสูงต่อฮีโมไซยานิน โดยไม่เกิดปฏิกิริยากับโปรตีนอื่นๆ และยังสามารถพัฒนาเทคนิค ELISA ที่มีความไวสูง ซึ่งสามารถวัดปริมาณฮีโมไซยานินได้ต่ำถึง 10 นาโนกรัม และใช้วัดปริมาณฮีโมไซยานินในฮีโมลิมฟ์ได้ โดยเมื่อทำการวัดตัวอย่างกุ้งแชบ๊วย 6 ตัวอย่าง พบว่ากุ้งแชบ๊วยมีปริมาณฮีโมไซยานินคิดเป็น 85.67% ของโปรตีนทั้งหมดในฮีโมลิมฟ์ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานในกุ้งขาว (Cariolou & Flytzanis, 1993) และในกุ้ง *P. japonicus* (Chen & Cheng, 1993) ที่พบว่า 80 - 95% ของโปรตีนในฮีโมลิมฟ์ของครัสเตเชียนเป็นฮีโมไซยานิน เนื่องจากยังไม่มีรายงานการศึกษาการตอบสนองของโปรตีนฮีโมไซยานินในฮีโมลิมฟ์ต่อการติดเชื้อก่อโรคในกุ้งชนิดอื่นๆ แต่มีการศึกษาการแสดงออกระดับยีนของฮีโมไซยานินในตับของกุ้ง *Macrobrachium nipponense* ที่ฉีดด้วยเชื้อ *Aeromonas hydrophila* พบว่ามีการแสดงออกของยีนฮีโมไซยานินเพิ่มขึ้น ณ ชั่วโมงที่ 3 หลังการฉีด (Wang, Xia, Liu, Chen, Yang & Ning, 2012) ในขณะที่ยีน ฮีโมไซยานินของกุ้งกุลาดำมีการแสดงออกเพิ่มขึ้นเมื่อถูกเหนี่ยวนำด้วยเชื้อ *V. harveyi* (Somboonwiwat, Chaikeeraisak, Wang, Fang & Tassanakajon, 2010) รวมทั้งยังพบว่าฮีโมไซยานินของกุ้งกุลาดำมีฤทธิ์ต้านไวรัสก่อโรคกุ้งชนิด White spot syndrome virus (Zhang, Huang & Qin, 2004) และจากรายงานที่พบเปปไทด์ด้านปลาย C ของฮีโมไซยานินมีปริมาณเพิ่มขึ้นในฮีโมลิมฟ์ของกุ้งขาวตอบสนองต่อการฉีดกุ้งด้วยเชื้อก่อโรค *Vibrio alginolyticus* หรือ *Fusarium oxysporum* ณ ชั่วโมงที่ 3 และ

เพิ่มสูงสุด ณ ชั่วโมงที่ 6 หลังการฉีด (Destoumieux-Garzon et al., 2001) ในงานวิจัยนี้เมื่อวัดปริมาณฮีโมไซยานินของกุ้งแชบ๊วยที่ถูกฉีดด้วยเชื้อก่อโรค *V. harveyi* พบว่าฮีโมไซยานินในฮีโมลิมฟ์มีปริมาณเพิ่มขึ้น ณ ชั่วโมงที่ 6 จนมีค่าสูงสุดที่ 12 ชั่วโมง หลังการฉีด จากผลงานวิจัยเหล่านี้บ่งชี้ว่าโปรตีนฮีโมไซยานินของกุ้งแชบ๊วยมีรูปแบบที่ตอบสนองต่อการฉีดเชื้อ *V. harveyi* สอดคล้องไปในทิศทางเดียวกับยีนฮีโมไซยานินของกุ้งอื่นๆ ที่มีรายงานมาก่อน ดังนั้นฮีโมไซยานินจึงเป็นโปรตีนหนึ่งที่อาจมีบทบาทเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันในกุ้ง ซึ่งควรมีการศึกษากลไกโดยละเอียดต่อไป

สรุป

งานวิจัยนี้สามารถทำให้ฮีโมไซยานินบริสุทธ์จากฮีโมลิมฟ์ของกุ้งแชบ๊วยด้วยวิธีอัลตราเซนตริฟิวจ์และการทำ Preparative PAGE ฮีโมไซยานินบริสุทธ์ปรากฏโปรตีน 1 แถบ ใน Non-denaturing PAGE และมีหน่วยย่อย 2 ขนาด คือ 75 และ 79.4 kDa ใน SDS-PAGE จากการสังเคราะห์แอนติบอดีต่อฮีโมไซยานินบริสุทธิ์ พบว่าแอนติบอดีมีความจำเพาะสูงต่อฮีโมไซยานินและถูกใช้ในการพัฒนาเทคนิค ELISA เพื่อใช้หาปริมาณฮีโมไซยานินในฮีโมลิมฟ์ได้ ซึ่งพบว่ามีปริมาณเป็น 85.67% ของโปรตีนทั้งหมดในฮีโมลิมฟ์ของกุ้งแชบ๊วยปกติ จากการฉีดกุ้งด้วย *V. harveyi* และวิเคราะห์ด้วยวิธี ELISA พบปริมาณฮีโมไซยานินในฮีโมลิมฟ์เพิ่มสูงขึ้นที่ 6 ชั่วโมง และเพิ่มสูงสุดที่ 12 ชั่วโมง หลังการฉีด จากนั้นมีค่าลดลง บ่งชี้ว่าฮีโมไซยานินถูกกระตุ้นได้ด้วยเชื้อก่อโรคกุ้งและน่าจะมีบทบาทเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันในกุ้ง ซึ่งควรมีการศึกษากลไกอย่างละเอียดต่อไป

ข้อเสนอแนะ

ควรมีการศึกษาการตอบสนองของยีนฮีโมไซยานินในกุ้งแชบ๊วยที่ถูกฉีดด้วย *V. harveyi*

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนวิจัยจากทุนงบประมาณแผ่นดินปี 2553 และขอขอบคุณภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ให้ทุนการศึกษาแก่ผู้เขียนจากโครงการความเป็นเลิศ สาขาชีวเคมี

รายการอ้างอิง

ประจวบ หล่าอุบล. (2531). **กุ้ง (NATANTIA).** ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

เมธี วัฒนสิงห์. (2543). การเลี้ยงกุ้งแชบ๊วยแบบพัฒนา ภูมิปัญญาคนไทย ตลาดในและนอกยังเปิดกว้าง. **วารสารสัตว์น้ำ, 11**(131), 5-16.

สุพจน์ จึงแย้มปิ่น และชัยรัตน์ พุ่มช่วย. (2543). ผลงานชิ้นโบแดงสถานีเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งจังหวัดตรังเลี้ยงพ่อแม่แชบ๊วยในบ่อดินสำเร็จ. **วารสารสัตว์น้ำ, 11**(132), 37-44.

Adachi, K., Endo, H., Watanabe, T., Nishioka, T. & Hirata, T. (2005). Hemocyanin in the exoskeleton of crustaceans: Enzymatic properties and immune-localization. **Pigment Cell Research, 18**, 136-143.

Adachi, K., Hirata, T., Nagai, K. & Sakaguchi, M. (2001). Hemocyanin a most likely inducer of black spots in kuruma prawn *Penaeus japonicus* during storage. **Journal of Food Science, 66**, 1130-1136.

Aspan, A., Huang, T., Cerenius, I. & S**ö**derhäll, K. (1995). cDNA cloning of prophenoloxidase from the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus* and its activation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 92**, 939-943.

Aspan, A. & Söderhäll, K. (1991). Purification of prophenoloxidase from crayfish blood cells and its activation by an endogeneous serine proteinase. **Insect Biochemistry, 21**, 363-373.

Auttarat, J., Phiriyangkul, P. & Utarabhand, P. (2006). Characterization of vitellin from the ovaries of the banana shrimp *Litopenaeus merguiensis*. **Comparative Biochemistry and Physiology, 143B**, 27-36.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry, 72**, 248-254.

Cariolou, M.A. & Flytzanis, C.N. (1993). Sex-specific gene expression in distinct tissues of the shrimp *Penaeus vannamei*. **Comparative Biochemistry and Physiology, 106B**, 705-716.

Chen, J.-C. & Cheng, S.-Y. (1993). Studies on haemocyanin and haemolymph protein levels of *Penaeus japonicus* based on sex, size and moulting cycle. **Comparative Biochemistry and Physiology, 106B**, 293-296.

Davis, B.J. (1964). Disc electrophoresis: II. Method and application to human serum protein. **Annals of the New York Academy of Sciences, 121**, 404-427.

Destoumieux-Garzon, D., Saulnier, D., Garnier, J., Jouffrey, C., Bulet, P., & Bachere, E. (2001). Crustacean Immunity. Antifungal peptides are generated from the C terminus of shrimp hemocyanin in response to microbial challenge. **Journal of Biological Chemistry, 276**, 47070-47077.

Figueroa-Soto, C.G., de la Barca, A.M.C., Vazquez-Moreno, L., Higuera-Ciapara, I., & Yepiz-Plascencia, G. (1997). Purification of Hemocyanin from White Shrimp (Penaeus vannamei Boone) by Immobilized Metal Affinity Chromatography. **Comparative Biochemistry and Physiology, 117B**, 203-208.

Jaenicke, E., Föll, R. & Decker, H. (1999). Spider hemocyanin binds ecdysone and 20-OH-ecdysone. **Journal of Biological Chemistry, 274**, 34267-34271.

Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structure protein during assembly of head of bacteriophage 74. **Nature, 227**, 680-685.

Ouchterlony, O. (1956). Antigen-antibody reactions in gel. IV. Type of reactions in co-ordinated systems of diffusion. **Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica, 32**, 231-240.

Paul, R.J. & Pirow, R. 1998. The physiological significance of respiratory proteins in invertebrates. **Zoology, 100**, 319-327.

Rittidach, W. (2006). **Characterization of sialic acid-specific lectin in the hemolymph of Banana shrimp (*Penaeus merguiensis*)**. Ph.D. Thesis, Prince of Songkla University, Songkhla, Thailand.

Söderhäll, K., & Cerenius, L. (1998). Role of the prophenoloxidase activating system in invertebrate immunity. **Current Opinion in Immunology, 10**, 23-28.

Somboonwiwat, K., Chaikeeratisak, V., Wang, H.C., Fang, L.C. & Tassanakajon A. (2010). Proteomic analysis of differentially expressed proteins in *Penaeus* monodon hemocytes after *Vibrio harveyi* infection. **Proteome Science, 8**(1), 39-50.

Spindler, K.D., Hennecke, R.G. & Gellissen, G. (1992). Protein production and the molting cycle in the crayfish *Astacus leptodactylus* (Nordmann, 1842). II. Hemocyanin and protein synthesis in the midgut gland. **General and Comparative Endocrinology, 85**, 248-253.

Van Holde, K.E., & Miller, K.I. (1995). Hemocyanins. In: **Advances in Protein Chemistry**, Anfinsen, C.B., Edsall, J.T., Eisenberg, D.S. and Richards, F.M., Eds. Academic Press Inc., New York, 47, 1-81.

Wallace, R.A. (1965). Resolution and isolation of avian and amphibian yolk granule protein using DEAE-cellulose. **Analytical Biochemistry, 11**, 297-311.

Wang, W., Xia, X., Liu, F., Chen, X., Yang, H., & Ning, Q. (2012). Cloning and characterization of the hemocyanin gene of prawn *Macrobrachium nipponense*. **Turkish Journal of Biochemistry, 37**(4), 348-355.

Zhang, X., Huang, C., & Qin, Q. (2004). Antiviral properties of hemocyanin isolated from shrimp *Penaeus monodon*. **Antiviral Research, 61**, 93-99.